

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-039435

(43)Date of publication of application : 08.02.2000

(51)Int.Cl.	G01N 33/573	A61C 19/04	C12Q 1/04
	C12Q 1/37	G01N 33/50	G01N 33/531

(21)Application number : 10-219889

(71)Applicant : SHIMA KENKYUSHO:KK

(22)Date of filing : 21.07.1998

(72)Inventor : HASHIMOTO MASAKATSU  
ASAMI KATSUHISA  
KITAMURA HIKARI

## (54) PERIODONTAL POCKET ELASTASE MEASURING REAGENT

### (57)Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To simply, accurately measure an elastase originated by granulocyte in a periodontal pocket collecting sample in a short time, by using a periodontal pocket content diluent liquid and granulocytic elastase measuring reagent.

**SOLUTION:** Since white blood cell or particularly granulocyte is early wetted to a gingival inner edge of a periodontal pocket prior to a periodontal change, a diagnosis of a periodontal disease can be rapidly and objectively diagnosed by measuring an elastase originated by the granulocyte. That is, a periodontal pocket content diluent liquid and granulocytic elastase measuring reagent are used.

Gingival groove liquid as a measuring sample, periodontal pocket plaque or the like as a measuring sample is collected by a manual scaler or the like, dissolved, suspended and diluted with diluent liquid. The diluent liquid is buffer composition and contains, for example, phosphoric acid, tris-hydrochloric acid or the like. As an immunological measuring method of the elastase originated by the granulocyte, a particle slide aggregation method, particle turbidimetric method, a solid-phase immunological marker antibody analysis method, an immunochromatography or the like is used.

Machine Translation of Reference 1 (JP 2000-39435)

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

**CLAIMS**

[Claim(s)]

[Claim 1] A periodontal-pocket elastase measuring reagent which consists of a periodontal-pocket content diluent and a granulocyte elastase measuring reagent.

[Claim 2] The periodontal-pocket elastase measuring reagent according to claim 1, wherein the periodontal-pocket content is gingival crevice fluid, a periodontal leaching solution, or a periodontal-pocket part plaque.

[Claim 3] The periodontal-pocket elastase measuring reagent according to claim 1, wherein the periodontal pocket content diluent contains at least any one of a hemolytic agent and alpha1-plasmin inhibitor.

[Claim 4] The periodontal-pocket elastase measuring reagent according to claim 3, wherein the hemolytic agent is a surfactant.

[Claim 5] The periodontal-pocket elastase measuring reagent according to claim 1, wherein an anti-elastase antibody sensitized particle is used as the granulocyte elastase measuring reagent

[Claim 6] The periodontal-pocket elastase measuring reagent according to claim 5, wherein a carrier particle of the anti-elastase antibody sensitized particle is a bacterial cell, a metallic colloid particle, a latex particle, or a synthetic particle.

[Claim 7] The periodontal pocket elastase measuring reagent according to claim 5, wherein the granulocyte elastase measuring reagent is a visual slide agglutination judging reagent or a reagent of a particle agglutination turbidimetric assay.

[Claim 8] The periodontal-pocket elastase measuring reagent according to claim 1, wherein an immobilized anti-elastase antibody and a labeled anti-elastase antibody are used as the granulocyte elastase measuring reagent

[Claim 9] The periodontal-pocket elastase measuring reagent according to claim 5 or 8, wherein the anti-elastase antibody is a polyclonal antibody, or one

kind or two kinds or more of monoclonal antibodies.

[Claim 10] The periodontal-pocket elastase measuring reagent according to claim 8, wherein the label is an enzyme.

[Claim 11] The periodontal-pocket elastase measuring reagent according to claim 1, wherein the granulocyte elastase measuring reagent is an immuno-chromato elastase measuring reagent.

[Claim 12] The periodontal-pocket elastase measuring reagent according to claim 11, which comprises a sample addition part, a particle-labeling anti-elastase antibody containing part, a detection part, and an absorption part in a chromatograph medium in the deployment move direction.

[Claim 13] The periodontal-pocket elastase measuring reagent according to claim 12, wherein the particle-labeling anti-elastase antibody is an anti-elastase antibody sensitized coloring particle, a liposome containing an anti-elastase antibody sensitized coloring particle, or a metallic colloid particle-labeling anti-elastase antibody.

[Claim 14] The periodontal-pocket elastase measuring reagent according to claim 12, wherein the detection part comprises one or two or more of anti-elastase antibody-immobilized parts.

[Claim 15] The periodontal-pocket elastase measuring reagent according to claim 13 or 14, wherein the labeled anti-elastase antibody is an anti-elastase monoclonal antibody, and the immobilized anti-elastase antibody is another anti-elastase monoclonal antibody or an anti-elastase polyclonal antibody.

---

## DETAILED DESCRIPTION

---

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application] This invention is directed to a periodontal-pocket elastase measuring reagent useful for the early diagnosis of a periodontal disease such as periodontoclasia.

[0002]

[Description of the Prior Art] Not less than 75% of adults have fallen ill, periodontoclasia is raised to a kind of a folk disease, and importance is attached to the prevention and a therapy.

[0003] Although there are 28 gear teeth by 20 and adult by a child, a dental root is firmly held via the periodontium of the shape of a tough muscle, and the

healthy gear tooth is protected by the alveolar bone of the bone of a jaw by the gum in the outside.

[0004] The plaque which accumulated in the periodontal pocket serves as a dental calculus, and it becomes a cause of a cavity or inflammation, the narrow portion which a gear tooth joins to the gum is called periodontal pocket, it is infected with periodontopathic bacteria and festers, and it will become periodontoclasia if it advance[ chronicity and ]-izes.

[0005] If the periodontium is infected with periodontopathic bacteria, granulocytes, such as neutrophil leucocyte, tend to gather by permeation of leucocytes, and tend to stop infection, but. If suitable treatment and a therapy are neglected, a gum crevicular epithelium will be destroyed gradually, the epithelial attachment with a gear tooth shifts in the direction of the root tip, as a result, the periodontal pocket becomes deep, and what is called c ecum is formed.

[0006] Although based also on condition, an early checkup and early treatment are the most important for which therapeutic method is used by there being various therapeutic methods else [, such as removal of dental calculus, radical plane lubrication washing, drug pasting, and disinfection, ], such as a surgical operation of a gingivectomy, gum exfoliation curettage, etc., in the therapy of the above-mentioned morbid periodontal pocket anyway, and it is effective.

[0007] Measurement of the gingival index according to macroscopic observation of dentist in the diagnosing method of periodontosis, There are measurement of the degree of alveolar bone absorption by the method and roentgenography which measure the periodontal-pocket temperature by the measuring needle which has measurement of the depth of the periodontal pocket by a periodontal probe and a thermo-sensitive device, measurement of periodontopathic bacteria, etc.

[0008]

[Problem to be solved by the invention] However, there are problems, like that dentist's judging standard has individual difference, that measurement takes a long time, diagnostic cost's being high, and the inflammation part of periodontosis cannot make a judgment of an activity period or a resting phase easily in these methods.

[0009]

[Means for solving problem] This invention person etc. -- periodontosis -- by preceding strangely and measuring the elastase of granulocyte origin paying attention to leucocytes, especially granulocyte permeating the gum common-law

marriage part of the periodontal pocket at an early stage, it could come to diagnose periodontosis promptly and objective, and this invention was completed. That is, this invention starts the periodontal-pocket elastase measuring reagent consisting of a periodontal-pocket contents diluent and a granulocyte elastase measuring reagent.

[0010] Gingival crevice fluid, a periodontal leaching solution, a periodontal-pocket part plaque, etc. can be used as a test portion, and these are extracted, for example by hand scaler etc., and are dissolved, suspended and diluted with a diluent.

[0011] It is a thing of buffer solution composition usually used, and diluents are phosphoric acid, tris-chloride, the glycine NaOH, etc., for example, they contain pH 7-9 and 0.15MNaCl, and can add proteins, such as BSA of 0.05 - 0.5(w/v)%, and casein.

[0012] As a leucocyte ingredient which permeates periodontium, 45 to 65% of neutrophil leukocyte, 0 to 5% of eosinophil leukocyte, 0 to 0.5% of basophil leukocyte, 3 to 10% of monocyte and 20 to 40% of a lymphocyte existed. neutrophil leukocyte, eosinophil leukocyte and basophil leukocyte which have granulation in intracellular are called as granulocyte. Therefore, although granulocyte occupies 45 to 70% of leucocytes and contains a lot of enzymes in intracellular, it has powerful proteolytic enzyme activity, and since there is also much content, especially the elastase can judge a damage degree of periodontium from elastase concentration.

[0013] Although granulocyte carries out phagocytosis of the periodontopathic bacteria etc., repeats enzyme treatment, such as elastase, and performs it within a vacuole, also itself it dies soon and cell content leaks it. If this becomes abundant, it will become pus, but in an early stage, it flows into gingival crevice fluid and a periodontal leaching solution. Granulocyte is activated in response to a stimulus of complement, an antigen-antibody complex, endotoxin, cytokine, etc., and emits a granulation ingredient. Neutral protease and active oxygen have destruction and a germicidal action to a foreign matter among those granulation ingredients, granulocyte elastase is contained in large quantities in neutral protease emitted, and its enzyme activity is strong.

[0014] In order substrate specificity of granulocyte elastase is low and to disassemble easily almost all living body composition proteins, such as elastin, collagen, proteoglycan, and fibronectin, By inhibitor, such as an alpha1-plasmin inhibitor and alpha 2-macroglobulin, it is controlled so that the elastase activity more than needed is not demonstrated. On the other hand, although said active

oxygen has a germicidal action powerful in itself, it also has the work which inactivates these inhibitor and makes granulocyte elastase activity maintain. Thereby, a powerful phylaxis function is exhibited in the circumference of the activated granulocyte, and the range limited extremely.

[0015] In order to make measurable elastase in the granulocyte which permeated the periodontium and was mixed in gingival crevice fluid etc., with a hemolyzing agent, granulocyte is hemolyzed, it destroys, and contents are made to emit. As a hemolyzing agent, there are a dodecyl trimethylammonium star's picture, dodecyl trimethylammonium chloride, saponin, lecithin, cholic acid, sodium dodecyl sulfate, polyoxyethylene octylphenyl ether, polyoxyethylene sorbitol ester, etc. the concentration of a hemolyzing agent -- 0.001-5(W/V)% -- it uses as solution of 0.05 - 1(W/V)% preferably. It is good also by the method of using other general hemolysis means, for example, an ultrasonic wave etc.

[0016] The elastase of granulocyte origin is the molecular weight 29500, and all over plasma and body tissue, it combines with inhibitor, such as an alpha1-plasmin inhibitor and alpha 2-macroglobulin, promptly, and is inactivated. The rate of an abundance ratio of an elastase alpha1-plasmin inhibitor complex and an elastase alpha 2-macroglobulin complex is 9:1, and most is a complex with an alpha1-plasmin inhibitor. Since an alpha1-plasmin inhibitor is the molecular weight 51000 and the molecular weight of an elastase alpha1-plasmin inhibitor complex is set to 80500, in order to measure a fixed quantity of granulocyte elastase, it is desirable to fix the molecular weight of a measuring object.

[0017] Therefore, it is good in said diluent to add an alpha1-plasmin inhibitor. What is necessary is just to do 0.05-2(v/V)% addition of such animal plasma, since the alpha1-plasmin inhibitor is contained so much in animal plasma, such as a rabbit, a sheep, a goat, a cow, and a horse. Since the wall surface of glassware is easy to adsorb, granulocyte elastase needs to use a plastic container as a container for dilution.

[0018] It is desirable to be based on an immunological technique from a point of singularity and the accuracy of measurement as a means to measure the elastase of granulocyte origin. The antibody to elastase may refine elastase by a publicly known method, or the polyclonal antibody produced by carrying out immunity to a rabbit, a goat, a guinea pig, a fowl, etc. may be used for it using commercial neutrophil leucocyte origin refining elastase. the anti-elastase monoclonal antibody produced from the hybridoma produced by carrying out the cell fusion of the anti-elastase antibody-positive splenic cells and the myeloma

cell of a mouse which are produced by carrying out immunity to a mouse by a polyethylene glycol -- one kind -- or two or more kinds may be used, combining. Which antibody of a polyclonal antibody and a monoclonal antibody of a private preparation or a commercial item is usable.

[0019] As immunoassay, an anti-elastase antibody A latex particle, metallic colloid particles, A particle slide agglutination method or a particle turbidimetric assay method insolubilized and used for carrier particles, such as a liposome, A solid phase-ized antibody and an enzyme which insolubilized an anti-elastase antibody in a well or a bead of a flat bottom, The immuno chromatography methods, such as solid phase immunity labelled antibody analysis methods using a labelled antibody which combined markers, such as a chemiluminescence substance, a fluorescent substance, and a radioactive material, with an anti-elastase antibody, such as enzyme immunoassay, a chemiluminescence-analysis method, fluoroimmunoassay, and radioimmunoassay, can be used.

[0020] By a particle slide agglutination method using latex, as carrier particles, for example, 3 micrometers or less, As a method of insolubilizing said anti-elastase antibody, using a 0.2-1.0-micrometer latex particle preferably, A general physical adsorption process or a chemical bond method with a water-soluble carbodiimide or a bifunctional reagent is used, and F(ab')<sub>2</sub> antibody fragment which removed Fc portion of an anti-elastase antibody by pepsin digestion if needed can also be used. Since an aggregate will be formed of an antigen-antibody reaction of elastase and anti-elastase if an elastase content sample and an anti-elastase antibody sensitization latex test solution are mixed on a sliding plate, existence of condensation is checked by viewing and existence of elastase is judged in a test portion.

[0021] In a particle turbidimetric assay method using latex, 1.6 micrometers or less of anti-elastase antibodies can be preferably insolubilized by the same method as the above using a 0.05-0.5-micrometer latex particle as carrier particles. It measures with an automatic analyzer or a latex condensation measuring device, and although a measured wavelength is based also on particle diameter of latex, it is 550-800 nm preferably 500-950 nm.

[0022] A solid phase-ized antibody which insolubilized an anti-elastase antibody as an example of enzyme immunoassay in a well or a bead of 96 holes for microtiters, or a flat bottom tray of an assembled die, Enzymes, such as peroxidase and alkaline phosphatase, using a sign anti-elastase antibody combined with anti-elastase by the sandwiches EIA method. Form a complex

proportional to the amount of elastases in a test portion, and the amount of enzymes in this complex, In the case of peroxidase, it uses as a substrate combining hydrogen peroxide and an alt.phenylenediamine, and it is made to color in the case of alkaline phosphatase, using 4-nitrophenyl phosphoric acid respectively as a substrate, and it is measured optically.

[0023] To a chromatograph medium, a sample addition part, a particle sign anti-elastase antibody content part, a primary detecting element, and an absorption part are provided in the deployment move direction one by one, and an immuno chromatography measuring reagent constitutes them.

[0024] The granulocyte elastase alpha1-plasmin inhibitor complex in the dilution sample which diluted the periodontal-pocket contents as quality of a detected material as a chromatograph medium, What is necessary is just a raw material of the porosity which synchronizes and can carry out deployment movement in the direction of a primary detecting element while the particle sign anti-elastase antibody impregnated by the particle labelled antibody content part carries out an antigen-antibody reaction, and construction material is chosen by the method of solid-phase-izing an anti-elastase antibody to a primary detecting element. For example, when using an anti-elastase antibody as a solid phase-ized antibody, fixing directly, it is desirable from a porous nitrocellulose membrane and an activation nylon membrane being easy for combination and solid-phase-izing of an antibody. When carrying out indirect immobilization of the anti-elastase antibody at a chromatograph medium and using it for carrier particles, such as latex, as adsorption or antibody solid phase-ized latex which carried out the chemical bond, The glass fiber of the aperture which bars deployment movement of antibody solid phase-ized latex, textile fabrics, a nonwoven fabric, etc. are used, and especially borosilicate glass fiber is preferred.

[0025] This chromatograph medium may constitute the whole from same porosity raw material, it may arrange the optimal raw material for every Type, such as a sample addition part, a particle sign anti-elastase antibody content part, a primary detecting element, and an absorption part, and it may constitute it so that deployment movement can be carried out continuously. [0026] A sample addition part is provided in the end side of a chromatograph medium, and, subsequently forms a particle sign anti-elastase antibody content part. as a particle labelled antibody -- an anti-elastase antibody -- coloring latex, a pigment content liposome, and metallic colloid particles -- adsorption -- or it is good to carry out a chemical bond, and to amplify and visualize a reaction. The existence



of the color of a particle labelled antibody is a relative thing with the color of a chromatograph medium, when a chromatograph medium is white, the colored nature of a labelled antibody is visualization judging top necessity, but a white particle labelled antibody can also be used by dyeing the chromatograph medium in the black or comparatively deep color. Although which antibody of a monoclonal antibody and a polyclonal antibody of the anti-elastase antibody for particle labelled antibodies is usable, Since the condensation of the antigen-antibody reaction connectives of elastase and a particle labelled antibody with the more nearly secondary monoclonal antibody does not take place, even if detection sensitivity is high and high-concentration elastase exists, deployment movement in a chromatograph medium is attained and a detection density range becomes large.

[0027] This particle sign anti-elastase antibody adds a protein ingredient, sugar, a surface-active agent, etc., and makes impregnate them, dries and saves them to a chromatograph medium so that deployment movement of the inside of a chromatograph medium can be carried out.

[0028] Next, when using a nitrocellulose membrane, an activation nylon membrane, etc. as a chromatograph medium, a primary detecting element. An anti-elastase antibody solution is spotted, or an anti-elastase antibody solution is applied crosswise [ of this chromatograph medium ] by a width of 1-2 mm, and also a several millimeters interval may be set to the deployment move direction downstream of a particle sign anti-elastase antibody content part, and may be applied to it two or more. Active parts other than the portion which solid-phase-ized the anti-elastase antibody are blocked with protein, such as BSA and casein, in advance of formation of a particle sign anti-elastase antibody content part, and prevent the nonspecific reaction. In using glass fiber as a chromatograph medium, Anti-elastase antibody sensitization latex may be similarly impregnated to the deployment move direction downstream of a particle sign anti-elastase antibody content part, it may apply and impregnate by a width of 1-2 mm crosswise [ of this chromatograph medium ], and also a several millimeters interval may be set, and two or more may be formed. Any of a polyclonal antibody and a monoclonal antibody may be sufficient as the anti-elastase antibody for these primary detecting element formation.

[0029] In order to promote deployment movement in an elastase alpha1-plasmin inhibitor complex which is quality of a detected material, or a chromatograph medium of a particle labelled antibody, an absorption part carries out contact arrangement of a filter paper, textile fabrics, a nonwoven fabric, the

water absorption pad, etc., and forms a water absorption part in the deployment move direction downstream of a primary detecting element.

[0030]

[Function] 0.3 ml of diluent which is prepared by adding 0.5(V/V)% of sheep plasma and 0.01(V/V)% of dodecyltrimethylammonium bromide to 0.15M NaCl - 20mM phosphate buffer solution (pH 8.5), are taken to a container. The periodontal-pocket contents extracted by hand scaler are added to the container and agitated, and then dissolved and diluted. If leucocytes exist in periodontal-pocket contents, the contents in leucocytes will be emitted by the hemolysis action of the surfactant. If granulocytes such as neutrophil leucocyte exist in leucocytes, enzymes such as elastase will elute from the granulation in such granulocytes.

[0031] 7 micro liter of this periodontal-pocket contents dilution sample is taken to a slide reaction plate, and 100micro liter of 0.1(W/V)%BSA-0.15MNaCl-0.1M glycine NaOH (pH 8.5) (glycine buffer solution for a reaction) is added, and it is agitated uniformly. Subsequently, if rotation rocking of 50 micro liter, in addition the slide reaction plate is carried out for an anti-elastase antibody sensitization latex test solution, the elastase in a dilution sample and an anti-elastase antibody sensitization latex test solution form an aggregate by an antigen-antibody reaction, and the existence of condensation can be judged by viewing in about 2 minutes. When condensation is accepted, it means that existence of granulocyte elastase becomes clear and granulation was emitted from the granulocyte which granulocyte existed in periodontal-pocket contents, or permeated the periodontium, and is judged as a periodontosis positivity. When condensation is not accepted, it is denied and existence of granulocyte elastase is judged to be periodontosis negativity.

[0032] If said periodontal-pocket elastase contents diluent 5mul is added and agitated at said glycine buffer solution 200mul for a reaction and anti-elastase antibody sensitization latex test solution 40mul is subsequently added and agitated when measuring with a latex turbidimetric assay method, The anti-elastase antibody by which sensitization was carried out to the elastase in a dilution sample and anti-elastase antibody sensitization latex carries out an antigen-antibody reaction, and antibody sensitization latex condenses according to elastase concentration. Absorption difference is calculated by measuring an absorbance for an antibody sensitization latex test solution with a proper measured wavelength, for example, 660 nm, after addition / churning, and also measuring an absorbance with an identical wavelength in several minutes.

[0033] The reference solution of elastase is beforehand measured by the same operation, the standard curve is created, and the elastase concentration in said dilution sample is calculated by this standard curve.

[0034] In the case of a solid phase immunity labelled antibody analysis method, the constant rate of said dilution sample is added to the well which adsorbed the mouse anti-elastase monoclonal antibody, Carry out a first order reaction at a room temperature for 30 minutes, and, subsequently a peroxidase-labeling anti-elastase polyclonal antibody is added, A second order reaction is carried out at a room temperature for 30 minutes, the substrate solution which consists of an alt.phenylenediamine and hydrogen peroxide after washing with a penetrant remover is added, after-reaction 2M sulfuric acid is added for 15 minutes at a room temperature, a reaction is suspended, and the absorbance of 490 nm is measured using an immuno leader.

[0035] Measurement of a reference solution is also performed by the same operation as the above, a standard curve is created, and the elastase concentration in a dilution sample is calculated like the case of the above-mentioned latex turbidimetric assay method below.

[0036] In the case of an immuno chromatography reagent, periodontal-pocket contents are diluted with the same operation as the above, and it inserts the sample addition part of a chromatograph medium in this dilution container. The elastase in a dilution sample arrives at an upside primary detecting element further, causing the anti-elastase antibody and antigen-antibody reaction by which carried out deployment movement of the inside of a chromatograph medium by capillarity, and reached the particle sign anti-elastase antibody content part, for example, the sign was carried out by the red colored latex particle etc. Since the anti-elastase antibody is solid-phase-ized by the chromatograph medium in this primary detecting element, the antigen antibody complex of the reaching elastase and the red latex sign anti-elastase antibody, An antigen-antibody reaction is carried out to a solid phase-ized anti-elastase antibody, it combines with a solid phase-ized anti-elastase antibody, and the anti-elastase antibody solid phase-ized part of this primary detecting element colors it red. With the passage of time, an excessive particle labelled antibody carries out deployment movement in the upper part, it is absorbed by the absorption part, and a red coloring band remains only in said primary detecting element. Thereby, existence of elastase is checked in a dilution sample and it is judged as those of granulocyte with permeation by the gear-tooth periphery.

[0037] By forming the band of the solid phase-ized anti-elastase antibody in

said primary detecting element three, when there are many amounts of elastases in a dilution sample, it colors one by one from the band of the solid phase-ized anti-elastase antibody of the downstream with deployment movement, and 2 or three coloring bands are revealed in proportion to the amount of elastases. Therefore, the amount of elastases is proportional to the number of the colored band, and the grade of permeation of the granulocyte of a gear-tooth periphery can also be judged.

[0038]

[Working example] Example 1

Physical adsorption of the sheep anti-elastase antibody (binding site company) was carried out to the polystyrene latex particle with a particle diameter of 0.2 micrometer with the conventional method, and sensitization was carried out to it. It floated with the 0.2M glycine NaCl buffer solution (pH 7.2) (it is considered as BSA-GSB below) which contains BSA 0.1%, and the anti-elastase antibody sensitization latex test solution was obtained.

[0039] The sheep plasma of 0.5(V/V)% and the dodecyl trimethylammonium star's picture of 0.01(V/V)% are added to the 0.1(W/V)%BSA-0.15MNaCl-0.1M glycine NaOH (pH 8.5) (glycine buffer solution for a reaction), and a diluent is prepared. 10 micro liter of the reference solution dilution sequence which is prepared by diluting neutrophil leucocyte origin elastase (Cosmobio) with said diluent, is added to an optical reaction vessel, and 200 micro liter of the glycine buffer solution for a reaction is added and stirred. Subsequently, 40 micro liter of said anti-elastase antibody sensitization latex test solution is added and stirred, the absorbance is measured on the wavelength of 660 nm at the time of 1 minute after a reaction start, and 5 minutes after a reaction start, calculate absorption difference, and the relation between each concentration of a reference solution and each absorption difference is plotted, and standard curve was created as shown in Fig.1 by using a three-dimensional log - logit formula.

[0040] Said 0.3 ml of diluents are taken to a well of an assembled-die microtiter tray, respectively, it adds, and periodontal-pocket contents extracted by hand scaler to this are agitated and diluted [ dissolve and ]. When there are two or more parts whose periodontosis is doubted, a tip of said scaler is wiped with absorbent cotton, and one by one, from another periodontal pocket, contents are extracted, and it dissolves and dilutes in a similar manner. If leucocytes exist in periodontal-pocket contents, contents in leucocytes will be emitted by hemolysis of a surface-active agent. If granulocytes, such as neutrophil leucocyte, exist in leucocytes, enzymes, such as elastase, will elute from granulation in such

granulocytes.

[0041] Each periodontal-pocket contents dilution sample was measured by the same operation as said reference solution, and it asked for elastase concentration by calculation by said standard curve from absorption difference of 1 minute at 660 nm of each dilution sample, and 5 minutes.

[0042] Example 2

Mouse anti-elastase monoclonal antibody (the Organon tecnica company) -- a flat bottom microtiter tray -- each -- it adsorbed and fixed to a well, it blocked with an after-washing BSA solution, and a solid phase-ized antibody tray was prepared. The sign of the horseradish peroxidase was carried out to an anti-elastase polyclonal antibody (binding site company) with a conventional method.

[0043] 3 micro liter of dilution samples I of said Embodiment 1 were added to a well of a flat bottom microtiter tray which insolubilized said elastase monoclonal antibody, the 100 micro liter addition of PBS containing 0.1(W/V)%BSA was done, and the first order reaction was carried out for 30 minutes at a room temperature. Next, said labelled antibody solution 100mul was added, and the second order reaction was carried out at a room temperature for 30 minutes. After adding a substrate solution (an alt.phenylenediamine / hydrogen peroxide) after washing and reacting for 15 minutes at a room temperature, a reaction was suspended with 3N sulfuric acid solution, an absorbance was measured at 490 nm, and a difference with an absorbance of a zero blank was calculated.

[0044] Measure an absorbance by the operation same also about a reference solution of elastase as the above, calculate a difference with an absorbance of zero blank, and relation between each concentration of a reference solution and each absorption difference is plotted, and standard curve was created as shown in Fig.2 by using a three-dimensional log - logit formula. Elastase concentration was calculated from the absorption difference of said dilution sample by this standard curve.

[0045] To the red coloring particle (Japan Synthetic Rubber Co., Ltd.) of styrene methacrylic acid copolymerization latex with embodiment 3 particle diameter of 0.27 micrometer. Sensitization of the anti-elastase monoclonal antibody (Organon tecnica company) was carried out by the same method as said Embodiment 1, it floated by 0.6(W/V)% polyvinyl alcohol BSA-GSB, and the red latex sign anti-elastase antibody was obtained.

[0046] A nitrocellulose membrane with the aperture of 8 micrometers (Sartorius K.K.) is cut in a size with a length 80mmx width of 60 mm, The IgG 2mg/ml

fraction solution of an anti-elastase polyclonal antibody (binding site company), The microprocessor control type micro injector which can eject an exact quantity of a reagent from a nozzle 1 mm in diameter is used, From the end (lower end) of the length direction of a nitrocellulose membrane to 37 mm. After having applied three to the place of 39 mm and 42 mm, having formed the primary detecting element in it so that a 1-mm-wide line might be drawn 60 mm crosswise, and making it dry at a room temperature for 1 hour, it was immersed in the 2(W/V)%BSA solution at the room temperature for 30 minutes, and the excessive binding site of the nitrocellulose membrane was blocked. After rinsing this nitrocellulose membrane enough with purified water, it dried at 30°C for 30 minutes.

[0047] Next, with the airbrush which attached the microprocessor control system for the solution which melted the saccharose of 60(W/V)% in purified water, it applied to one side of the side in which the primary detecting element of said nitrocellulose membrane was formed, completely, and the under coat was formed in it.

[0048] With said airbrush, from the lower end of the nitrocellulose membrane in which said under coat was formed, open 7 mm and crosswise said red latex sign anti-elastase antibody by a width of 10 mm. It applied directly on said under coat with said airbrush, the coloring particle sign anti-elastase antibody content part was formed, and it dried at 30°C for 30 minutes. The range of 7 mm was made into the sample addition part from the lower end of this nitrocellulose membrane.

[0049] This nitrocellulose membrane is cut in the length direction by a width of 6 mm, It sticks on the base material (6x80 mm) made of an acrylic resin by a double faced adhesive tape, 6x10 mm (pole company) of water absorption pads for immuno chromatography were stuck above [ which was formed in said nitrocellulose membrane ] the primary detecting element (the deployment move direction downstream), the absorption part was formed, and the measuring reagent for immuno chromatography was prepared.

[0050] If the sample addition part of an immuno chromatography measuring reagent is inserted and stood to the well of the microtiter tray of the assembled die containing the periodontal-pocket contents dilution sample extracted and diluted by the same method as said Embodiment 1, As ingredients, such as granulocyte elastase in a dilution sample, sink in melting an under coat with water, they begin to carry out deployment movement of the inside of the nitrocellulose membrane which is a chromatograph medium according to capillarity in the upper part.

[0051] If ingredients, such as elastase in a dilution sample, reach a coloring particle sign anti-elastase antibody content part, when elastase exists, while the anti-elastase antibody by which the sign was carried out by elastase and red latex carries out an antigen-antibody reaction and forms an antigen antibody complex, deployment movement is carried out further in the upper part. Since the anti-elastase antibody by which the sign was carried out by red latex is a monoclonal antibody, carry out an antigen-antibody reaction to elastase, and join together, but. The elastase combined with the anti-elastase monoclonal antibody carries out deployment movement of the inside of a chromatograph medium, without forming a big aggregate, since other anti-elastase monoclonal antibodies in the circumference cannot carry out a second order reaction.

[0052] If an elastase antigen antibody complex arrives at a primary detecting element, to the anti-elastase polyclonal antibody solid-phase-ized by this primary detecting element. The antigen antibody complex of an elastase red latex sign anti-elastase antibody is caught one by one by the antigen-antibody reaction, and the first coloring band is revealed to the anti-elastase antibody solid phase-ized part of the upstream. If elastase does not exist in said periodontal-pocket contents dilution sample, an antigen-antibody reaction does not occur and a coloring band is not accepted. When elastase exists comparatively mostly, the first anti-elastase solid phase-ized part is saturated, the antigen antibody complex which was not able to be caught is caught by the second anti-elastase antibody solid phase-ized part, and the second coloring band is revealed. When elastase exists in large quantities, the second anti-elastase antibody solid phase-ized part is saturated, and the third coloring band is revealed. A red latex sign anti-elastase antibody finished shifting to the water absorption pad of the upper bed in about 15 minutes, and the band dyed the red of the primary detecting element by viewing was checked and judged.

[0053]

[Effect of the Invention] As stated above, in this invention, among the leucocytes in a periodontal-pocket extracted sample, hemolysis dilution is carried out, and the elastase of granulocyte origin is detected and measured with an immunological measuring reagent.

Therefore, periodontal-pocket elastase can be measured with sufficient accuracy comparatively easily in a short time.

# 対応なし、英抄

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-39435

(P2000-39435A)

(43) 公開日 平成12年2月8日 (2000.2.8)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード <sup>*</sup> (参考)
G 0 1 N 33/573		G 0 1 N 33/573	A 2 G 0 4 5
A 6 1 C 19/04		C 1 2 Q 1/04	4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/04		1/37	4 C 0 5 2
1/37		G 0 1 N 33/50	G
G 0 1 N 33/50		33/531	B
審査請求 未請求 請求項の数15 F D (全 7 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願平10-219889

(22) 出願日 平成10年7月21日 (1998.7.21)

(71) 出願人 391025811

株式会社シマ研究所

東京都板橋区大谷口2-41-9

(72) 発明者 橋本 正勝

東京都板橋区幸町五番十五-八〇 宅号

(72) 発明者 浅見 勝久

埼玉県越谷市北越谷2-37-13

(72) 発明者 北村 光

埼玉県三郷市鷹野2-201

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 歯周ポケットエラスターゼ測定試薬

(57) 【要約】

【目的】 歯周病変の進行度に比例する、歯周ポケット内の顆粒球由来エラスターゼを、簡単な操作で検出、測定する。

【構成】 スケーラー等で採取した歯周ポケット内容物を、溶血剤とインヒビターを含む希釈液で溶血・希釈し、溶解したエラスターゼを粒子スライド凝集法、粒子免疫比濁法、固相免疫標識抗体測定法、イムノクロマト法等の免疫学的測定試薬により検出、測定する。



**【特許請求の範囲】**

【請求項 1】 歯周ポケット内容物希釈液と顆粒球エラスターゼ測定試薬とからなることを特徴とする歯周ポケットエラスターゼ測定試薬。

【請求項 2】 歯周ポケット内容物が歯肉溝液、歯周浸出液、歯周ポケット部ブランクである請求項 1 記載の歯周ポケットエラスターゼ測定試薬。

【請求項 3】 歯周ポケット内容物希釈液が溶血剤、 $\alpha$ 1-プラスミンインヒビターの少なくともいずれかを含む請求項 1 記載の歯周ポケットエラスターゼ測定試薬。

【請求項 4】 溶血剤が界面活性剤である請求項 3 記載の歯周ポケットエラスターゼ測定試薬。

【請求項 5】 顆粒球エラスターゼ測定試薬が、抗エラスターゼ抗体感作粒子を用いる請求項 1 記載の歯周ポケットエラスターゼ測定試薬。

【請求項 6】 抗エラスターゼ抗体感作粒子の担体粒子が菌体細胞、金属コロイド粒子、ラテックス粒子、合成粒子のいずれかである請求項 5 記載の歯周ポケットエラスターゼ測定試薬。

【請求項 7】 顆粒球エラスターゼ測定試薬が目視によるスライド凝集判定試薬、粒子凝集比濁法のいずれかである請求項 5 記載の歯周ポケットエラスターゼ測定試薬。

【請求項 8】 顆粒球エラスターゼ測定試薬が、固相化抗エラスターゼ抗体と標識化抗エラスターゼ抗体とを用いる請求項 1 記載の歯周ポケットエラスターゼ測定試薬。

【請求項 9】 抗エラスターゼ抗体がポリクローナル抗体、一種類又は 2 種類以上のモノクローナル抗体である請求項 5 又は請求項 8 記載の歯周ポケットエラスターゼ測定試薬。

【請求項 10】 標識物が酵素である請求項 8 記載の歯周ポケットエラスターゼ測定試薬。

【請求項 11】 顆粒球エラスターゼ測定試薬がイムノクロマトエラスターゼ測定試薬である請求項 1 記載の歯周ポケットエラスターゼ測定試薬。

【請求項 12】 クロマトグラフ媒体に試料添加部、粒子標識抗エラスターゼ抗体含有部、検出部、吸収部を展開移動方向に順次設けてなる請求項 11 記載の歯周ポケットエラスターゼ測定試薬。

【請求項 13】 粒子標識抗エラスターゼ抗体が抗エラスターゼ抗体感作着色粒子、抗エラスターゼ抗体感作着色物質含有リボソーム、金属コロイド粒子標識抗エラスターゼ抗体のいずれかである請求項 12 記載の歯周ポケットエラスターゼ測定試薬。

【請求項 14】 検出部に抗エラスターゼ抗体固相化部位を一カ所、又は 2 カ所以上有する請求項 12 記載の歯周ポケットエラスターゼ測定試薬。

【請求項 15】 標識抗エラスターゼ抗体が抗エラス

ターゼモノクローナル抗体で、固相化抗エラスターゼ抗体が別の抗エラスターゼモノクローナル抗体又は抗エラスターゼポリクローナル抗体である請求項 13 又は 14 記載の歯周ポケットエラスターゼ測定試薬。

**【発明の詳細な説明】****【0001】**

【産業上の利用分野】 本発明は歯槽膿漏等の歯周病の早期診断に有用な歯周ポケットエラスターゼ測定試薬にかかるものである。

**【0002】**

【従来の技術】 歯槽膿漏は成人の 75% 以上が罹患しており、国民病の一種にあげられ、その予防、治療が重要視されている。

【0003】 歯は子供で 20 本、成人で 28 本あるが、健康な歯はあごの骨の歯槽骨に、強靱な筋状の歯根膜を介して歯の根がしっかりと保持され、その外側を歯茎によって保護されている。

【0004】 歯茎と歯の接合するくびれた部分が歯周ポケットといわれ、歯周ポケット内にたまったブランクが歯石となって虫歯や炎症の原因となり、歯周病原性細菌に感染して化膿し、慢性・進行化すると歯槽膿漏になる。

【0005】 歯周組織は歯周病原性細菌に感染すると、白血球の浸潤により好中球等の顆粒球が集まり、感染をくい止めようとするが、適切な処置、治療を怠ると歯肉内縁上皮が次第に破壊され、歯との上皮付着は根尖方向に移行し、その結果歯周ポケットは深くなり、いわゆる盲嚢が形成される。

【0006】 上記病的歯周ポケットの治療には歯石除去、根面滑沢、洗浄、薬物貼付、消毒などの他に、歯肉切除、歯肉剥離掻爬等の外科的手術等、種々の治療方法があり、どの治療方法を用いるかは症状にもよるが、いずれにしても早期診断・早期治療が最も重要であり、効果的である。

【0007】 歯周病の診断方法には歯科医師の肉眼的観察による歯肉炎指数の測定、ペリオドンタル・プローブによる歯周ポケットの深さの測定、感温素子を有する測定針による歯周ポケット温度を測定する方法、レントゲン写真による歯槽骨吸収度の測定、歯周病原性細菌の測定等がある。

**【0008】**

【発明が解決しようとする課題】 しかし、これらの方法には、歯科医師の判定基準に個人差があること、測定に長時間を要すること、診断コストが高いこと、歯周病の炎症部位が活動期か静止期かの判断がしにくい等の問題点がある。

**【0009】**

【課題を解決するための手段】 本発明者等は歯周病変に先だって、歯周ポケットの歯肉内縁部に、白血球特に顆粒球が早期に浸潤する事に着目し、顆粒球由来のエラス

ターゼを測定することにより、歯周病の診断を迅速且つ客観的にに行い得るに至り、本発明を完成した。すなわち本発明は、歯周ポケット内容物希釈液と顆粒球エラスターゼ測定試薬からなることを特徴とする歯周ポケットエラスターゼ測定試薬にかかるものである。

【0010】測定試料として歯肉溝液、歯周浸出液、歯周ポケット部ブラーク等が使用でき、これらは、例えば手用スケーラー等で採取し、希釈液で溶解、懸濁、希釈する。

【0011】希釈液は通常用いられる緩衝液組成のもので、例えばリン酸、トリス-塩酸、グリシン-NaOH等で、pH7~9、0.15M NaClを含有し、0.05~0.5(w/v)%のBSA、カゼイン等の蛋白を加えることができる。

【0012】歯周組織に浸潤する白血球成分としては、好中球が45~65%、抗酸球が0~5%、好塩基球が0~0.5%、単球が3~10%、リンパ球が20~40%それぞれ存在し、細胞内に顆粒を有する好中球、抗酸球、好塩基球を顆粒球と称している。従って、顆粒球は白血球の45~70%を占め、細胞内に多量の酵素を含有するが、特にエラスターゼは強力な蛋白分解酵素活性を有し且つ含有量も多いので、エラスターゼ濃度から歯周組織の損傷程度を判断することが可能である。

【0013】顆粒球は歯周病原性細菌等を貪食し、空胞内でエラスターゼ等の酵素処理を繰り返し行うが、やがて自らも死に、細胞内容物が漏出する。これが多量になると膿となるが、初期の段階では歯肉溝液、歯周浸出液中に流入する。又、顆粒球は補体、抗原抗体複合物、エンドトキシン、サイトカイン等の刺激に反応して活性化し、顆粒成分を放出する。それらの顆粒成分のうち異物に対して破壊・殺菌作用を持つのは中性プロテアーゼと活性酸素であり、顆粒球エラスターゼは放出される中性プロテアーゼの中で最も大量に含まれ且つ酵素活性が強い。

【0014】顆粒球エラスターゼは、基質特異性が低く、エラスチン、コラーゲン、プロテオグリカン、フィブロネクチン等ほとんどすべての生体構成蛋白を容易に分解し得るため、 $\alpha 1$ -プラスミンインヒビター、 $\alpha 2$ -マクログロブリン等のインヒビターにより、必要以上のエラスターゼ活性が発揮されないようコントロールされている。反面、前記活性酸素はそれ自体強力な殺菌作用を有しているが、これらのインヒビターを不活性化して顆粒球エラスターゼ活性を持続させる働きも有している。これにより、活性化された顆粒球の周辺のみと極めて限定された範囲で、強力な感染防御機能が発揮される。

【0015】又、歯周組織に浸潤して歯肉溝液等に混入した顆粒球中のエラスターゼを測定可能にするためには、溶血剤により顆粒球を溶血、破壊し、内容物を放出させる。溶血剤としては、ドデシルトリメチルアンモニウム

ブロマイド、ドデシルトリメチルアンモニウムクロライド、サポニン、レシチン、コール酸、ドデシル硫酸ナトリウム、ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンソルビトールエステル等がある。溶血剤の濃度は、0.001~5(W/V)%好ましくは0.05~1(W/V)%の水溶液として用いる。又、他の一般的な溶血手段、例えば超音波等を用いる方法によってもよい。

【0016】顆粒球由来のエラスターゼは分子量29500で、血漿中及び体組織中では $\alpha 1$ -プラスミンインヒビター、 $\alpha 2$ -マクログロブリン等のインヒビターと直ちに結合して不活性化される。エラスターゼ- $\alpha 1$ -プラスミンインヒビター複合体とエラスターゼ- $\alpha 2$ -マクログロブリン複合体の存在比率は9:1であり、ほとんどが $\alpha 1$ -プラスミンインヒビターとの複合体である。 $\alpha 1$ -プラスミンインヒビターは分子量51000であるため、エラスターゼ- $\alpha 1$ -プラスミンインヒビター複合体の分子量は80500となるので、顆粒球エラスターゼを定量測定するためには、測定対象物の分子量を一定にしておくことが望ましい。

【0017】そのため、前記希釈液中に $\alpha 1$ -プラスミンインヒビターを添加しておくことよい。 $\alpha 1$ -プラスミンインヒビターはウサギ、ヒツジ、ヤギ、ウシ、ウマ等の動物血漿中に多量に含まれているので、これらの動物血漿を0.05~2(V/V)%添加すればよい。更に、顆粒球エラスターゼはガラス容器の壁面に吸着されやすいため、プラスチック容器を希釈用容器として使用する必要がある。

【0018】顆粒球由来のエラスターゼを測定する手段としては、特異性、測定精度の点から免疫学的な手法によるのが望ましい。エラスターゼに対する抗体は、公知の方法でエラスターゼを精製し、或いは市販の好中球由来精製エラスターゼを用い、ウサギ、ヤギ、モルモット、ニワトリ等に免疫して得られるポリクローナル抗体を使用してもよい。又、マウスに免疫して得られる抗エラスターゼ抗体陽性の脾細胞とマウスのミエローマ細胞とをポリエチレングリコールにより細胞融合して得られるハイブリドーマから産生される抗エラスターゼモノクローナル抗体を、一種類又は二種類以上組み合わせ使用してもよい。ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体いずれの抗体とも、自家調製品若しくは市販品が使用可能である。

【0019】免疫学的測定法としては、抗エラスターゼ抗体をラテックス粒子、金属コロイド粒子、リボソーム等の担体粒子に不溶化して使用する粒子スライド凝集法若しくは粒子比濁法、平底のウエル又はビーズに抗エラスターゼ抗体を不溶化した固相化抗体と酵素、化学発光物質、蛍光物質、放射性物質等の標識物質を抗エラスターゼ抗体に結合した標識抗体とを用いる酵素免疫測定法、化学発光分析法、蛍光免疫測定法、放射免疫測定法

等の固相免疫標識抗体分析法等、或いはイムノクロマト法が使用できる。

【0020】例えば、ラテックスを用いた粒子スライド凝集法では担体粒子として $3\mu\text{m}$ 以下、好ましくは $0.2\sim 1.0\mu\text{m}$ のラテックス粒子を用い、前記抗エラストラーゼ抗体を不溶化する方法としては、一般的な物理的吸着法、或いは水溶性カルボジイミドやニ官能性試薬による化学結合法が用いられ、必要に応じてペプシン処理により抗エラストラーゼ抗体のFc部分を除去したF(ab')<sub>2</sub>抗体フラグメントも使用できる。エラストラーゼ含有試料と抗エラストラーゼ抗体感作ラテックス試液とをスライド板上で混合すると、エラストラーゼと抗エラストラーゼとの抗原抗体反応により凝集塊が形成されるので、目視により凝集の有無を確認し、測定試料中にエラストラーゼの有無を判定する。

【0021】又、ラテックスを用いた粒子比濁法では、担体粒子として $1.6\mu\text{m}$ 以下好ましくは $0.05\sim 0.5\mu\text{m}$ のラテックス粒子を用い、前記と同様の方法で抗エラストラーゼ抗体を不溶化することができる。自動分析装置やラテックス凝集測定装置により測定を行い、測定波長はラテックスの粒子径にもよるが $500\sim 950\text{nm}$ 、好ましくは $550\sim 800\text{nm}$ である。

【0022】酵素免疫測定法の例としては、マイクロタイター用96穴若しくは分割型の平底トレイのウェル又はビーズに抗エラストラーゼ抗体を不溶化した固相化抗体と、ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ等の酵素を抗エラストラーゼに結合した標識抗エラストラーゼ抗体を用いて、サンドイッチEIA法により、測定試料中のエラストラーゼ量に比例した複合体を形成し、該複合体中の酵素量を、ペルオキシダーゼの場合は過酸化水素とオルトフェニレンジアミンを組み合わせることで基質として用い、アルカリフォスファターゼの場合は4-ニトロフェニルリン酸を基質としてそれぞれ用いて発色させ光学的に測定する。

【0023】更に、イムノクロマト測定試薬は、クロマトグラフ媒体に、試料添加部、粒子標識抗エラストラーゼ抗体含有部、検出部、吸収部を展開移動方向に順次設けて構成する。

【0024】クロマトグラフ媒体としては、被検出物質としての歯周ポケット内容物を希釈した希釈試料中の顆粒球エラストラーゼ- $\alpha 1$ -プラスミンインヒビター複合体と、粒子標識抗体含有部に含浸された粒子標識抗エラストラーゼ抗体とが抗原抗体反応をしながら同期して検出部の方向に展開移動し得る多孔質の素材であればよく、検出部に抗エラストラーゼ抗体を固相化する方法により材質を選択する。例えば、固相化抗体として抗エラストラーゼ抗体を直接固定して使用する場合は、多孔性ニトロセルロースメンブラン、活性化ナイロンメンブランが抗体の結合・固相化が容易であることから望ましい。又、抗エラストラーゼ抗体をラテックス等の担体粒子に吸着又は

化学結合した抗体固相化ラテックスとして、クロマトグラフ媒体に間接固定して用いる場合は、抗体固相化ラテックスの展開移動を妨げる孔径のグラスファイバー、織布、不織布等が用いられ、特にポロシリケート・グラスファイバーが好適である。

【0025】該クロマトグラフ媒体は全体を同一の多孔質素材で構成してもよく、試料添加部、粒子標識抗エラストラーゼ抗体含有部、検出部、吸収部等の各区分毎に最適の素材を配置して、これらの間を連続的に展開移動できるよう構成してもよい。

【0026】試料添加部は、クロマトグラフ媒体の一端側に設け、次いで粒子標識抗エラストラーゼ抗体含有部を形成する。粒子標識抗体としては抗エラストラーゼ抗体を着色ラテックス、色素含有リポソーム、金属コロイド粒子に吸着又は化学結合し、反応を増幅・可視化するとよい。粒子標識抗体の色の有無はクロマトグラフ媒体の色の相対的なものであり、クロマトグラフ媒体が白色の場合は標識抗体の有色性は可視化判定上必要であるが、クロマトグラフ媒体を黒色又は比較的濃い色で染色しておくことにより、白色の粒子標識抗体も使用できる。粒子標識抗体用の抗エラストラーゼ抗体はモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体のいずれの抗体とも使用可能であるが、モノクローナル抗体のほうがエラストラーゼと粒子標識抗体との抗原抗体反応結合物どうしの二次的な凝集が起こらないため、検出感度が高く、高濃度のエラストラーゼが存在してもクロマトグラフ媒体内の展開移動が可能となり検出濃度範囲が広がる。

【0027】該粒子標識抗エラストラーゼ抗体はクロマトグラフ媒体内を展開移動し得るよう、蛋白成分、糖、界面活性剤等を添加して、クロマトグラフ媒体に含浸させ、乾燥して保存する。

【0028】次に、検出部はクロマトグラフ媒体としてニトロセルロースメンブラン、活性化ナイロンメンブラン等を使用する場合には、粒子標識抗エラストラーゼ抗体含有部の展開移動方向下流側に、抗エラストラーゼ抗体溶液をスポットするか、該クロマトグラフ媒体の幅方向に $1\sim 2\text{mm}$ の幅で抗エラストラーゼ抗体溶液を塗布し、更に数mmの間隔をおいて複数本塗布してもよい。抗エラストラーゼ抗体を固相化した部分以外の活性部分は粒子標識抗エラストラーゼ抗体含有部の形成に先立ってBSA、カゼイン等の蛋白質でブロックしておき、非特異反応を防止しておく。又、クロマトグラフ媒体としてグラスファイバーを用いる場合には、抗エラストラーゼ抗体感作ラテックスを同様に粒子標識抗エラストラーゼ抗体含有部の展開移動方向下流側に含浸するか、該クロマトグラフ媒体の幅方向に $1\sim 2\text{mm}$ の幅で塗布・含浸し、更に数mmの間隔をおいて複数本形成してもよい。これらの検出部形成用の抗エラストラーゼ抗体はポリクローナル抗体、モノクローナル抗体のいずれでもよい。

【0029】更に、吸収部は被検出物質であるエラスト

10

20

30

40

50

ーゼ- $\alpha$ 1-プラスミンインヒビター複合体や粒子標識抗体のクロマトグラフ媒体内の展開移動を促進するために検出部の展開移動方向下流側に、濾紙、織布、不織布、吸水パッド等を接触配置して吸水部を形成する。

#### 【0030】

【作用】0.15M NaCl - 20mMリン酸緩衝液 (pH 8.5) に0.5 (V/V) %のヒツジ血漿及び0.01 (V/V) %のドデシルトリメチルアンモニウムブロマイドを加えた希釈液を希釈容器に0.3mlとり、これに手用スケーラーで採取した歯周ポケット内容物を添加し、攪拌して溶解、希釈する。歯周ポケット内容物中に白血球が存在すると界面活性剤の溶血作用により、白血球中の内容物が放出される。白血球中に好中球等の顆粒球が存在すれば、これらの顆粒球内の顆粒からエラスターゼ等の酵素が溶出する。

【0031】この歯周ポケット内容物希釈試料をスライド反応板に7 $\mu$ lとり、0.1 (W/V) % BSA - 0.15M NaCl - 0.1Mグリシン - NaOH (pH 8.5) (反応用グリシン緩衝液) を100 $\mu$ l加えて均一に攪拌し、次いで抗エラスターゼ抗体感作ラテックス試液を50 $\mu$ l加えて、スライド反応板を回転揺動すると、希釈試料中のエラスターゼと抗エラスターゼ抗体感作ラテックス試液とが、抗原抗体反応により凝集塊を形成し、約2分間で目視により凝集の有無が判定できる。凝集が認められた場合、顆粒球エラスターゼの存在が明らかとなり、歯周ポケット内容物中に顆粒球が存在するか、又は歯周組織に浸潤した顆粒球から顆粒が放出されたことになり、歯周病陽性と判断される。又凝集が認められない場合は顆粒球エラスターゼの存在は否定され、歯周病陰性と判断される。

【0032】ラテックス比濁法で測定する場合は、前記歯周ポケットエラスターゼ内容物希釈液5 $\mu$ lを前記反応用グリシン緩衝液200 $\mu$ lに添加・攪拌し、次いで抗エラスターゼ抗体感作ラテックス試液40 $\mu$ lを添加・攪拌すると、希釈試料中のエラスターゼと抗エラスターゼ抗体感作ラテックスに感作された抗エラスターゼ抗体とが抗原抗体反応し、抗体感作ラテックスがエラスターゼ濃度に応じて凝集する。抗体感作ラテックス試液を添加・攪拌後、適宜の測定波長例えば660nmにより吸光度を測定し、更に数分後に同一波長により吸光度を測定して吸光度差を計算する。

【0033】予めエラスターゼの標準液を同様の操作で測定して標準曲線を作成しておき、該標準曲線により前記希釈試料中のエラスターゼ濃度を計算する。

【0034】又、固相免疫標識抗体分析法の場合は、前記希釈試料の一定量をマウス抗エラスターゼモノクローナル抗体を吸着したウエルに添加し、室温で30分一次反応し、次いでペルオキシダーゼ標識抗エラスターゼポリクローナル抗体を添加し、室温で30分二次反応し、洗浄液で洗浄後、オルトフェニレンジアミン及び過酸化

水素からなる基質溶液を加え、室温で15分間反応後2M硫酸を加えて反応を停止し、イムノリーダーを用いて490nmの吸光度を測定する。

【0035】標準液の測定も以上と同様の操作で行って標準曲線を作成し、以下前述のラテックス比濁法の場合と同様に希釈試料中のエラスターゼ濃度が計算される。

【0036】イムノクロマト試薬の場合は、前記と同様の操作で歯周ポケット内容物の希釈を行い、該希釈容器にクロマトグラフ媒体の試料添加部を挿入する。希釈試料中のエラスターゼはクロマトグラフ媒体内を毛細管現象で展開移動し、粒子標識抗エラスターゼ抗体含有部に到達し、例えば赤色の着色ラテックス粒子等で標識された抗エラスターゼ抗体と抗原抗体反応を起こしながら更に上部の検出部に到達する。該検出部には抗エラスターゼ抗体がクロマトグラフ媒体に固相化されているので、到達してくるエラスターゼと赤色ラテックス標識抗エラスターゼ抗体との抗原抗体複合体は、固相化抗エラスターゼ抗体と抗原抗体反応して固相化抗エラスターゼ抗体に結合し、該検出部の抗エラスターゼ抗体固相化部位が赤色に着色する。更に時間の経過とともに、余分の粒子標識抗体が上方に展開移動し、吸収部に吸収され、前記検出部のみに赤色の着色バンドが残る。これにより、希釈試料中にエラスターゼの存在が確認され、歯周部に顆粒球の浸潤ありと判断される。

【0037】前記検出部に固相化抗エラスターゼ抗体のバンドを3本形成しておくことにより、希釈試料中のエラスターゼ量が多い場合は、展開移動とともに下流側の固相化抗エラスターゼ抗体のバンドから順次着色し、エラスターゼ量に比例して2本或いは3本の着色バンドが発現する。従って、着色したバンドの本数にエラスターゼ量が比例し、歯周部の顆粒球の浸潤の程度も判断できる。

#### 【0038】

##### 【実施例】実施例1

市販の粒子径0.2 $\mu$ mのポリスチレンラテックス粒子にヒツジ抗エラスターゼ抗体 (バインディングサイト社) を常法により物理吸着させて感作した。0.1% BSAを含む0.2Mグリシン - NaCl緩衝液 (pH 7.2) (以下BSA-GSBとする) により浮遊し、抗エラスターゼ抗体感作ラテックス試液を得た。

【0039】0.1 (W/V) % BSA - 0.15M NaCl - 0.1Mグリシン - NaOH (pH 8.5) (反応用グリシン緩衝液) に0.5 (V/V) %のヒツジ血漿及び0.01 (V/V) %のドデシルトリメチルアンモニウムブロマイドを加えて希釈液を調製する。好中球由来エラスターゼ (コスモバイオ社) を前記希釈液で希釈した標準液希釈列を、光学的反応容器にそれぞれ10 $\mu$ l採取し、反応用グリシン緩衝液を200 $\mu$ l添加・攪拌し、次いで前記抗エラスターゼ抗体感作ラテックス試液を40 $\mu$ l添加・攪拌し、反応開始後1分及び

5分の吸光度を波長660nmで測定し、吸光度差を計算し、標準液の各濃度とそれぞれの吸光度差との関係をプロットすると共に、3次元のログ-ロジット計算式により

【図1】に示す標準曲線を作成した。

【0040】前記希釈液を分割型マイクロタイタートレイのウェルにそれぞれ0.3mlとり、これに手用スクレーパーで採取した歯周ポケット内容物を添加し、攪拌して溶解、希釈する。歯周病を疑われる部位が複数箇所ある場合には、前記スクレーパーの先端を脱脂綿で拭い、順次別の歯周ポケットから内容物を採取し、同様に溶解、希釈する。歯周ポケット内容物中に白血球が存在すると界面活性剤の溶血作用により、白血球中の内容物が放出される。白血球中に好中球等の顆粒球が存在すれば、これらの顆粒球内の顆粒からエラスターゼ等の酵素が溶出する。

【0041】各歯周ポケット内容物希釈試料を前記標準液と同様の操作で測定し、各希釈試料の660nmにおける1分及び5分の吸光度差から、前記標準曲線によりエラスターゼ濃度を計算により求めた。

【0042】実施例2

マウス抗エラスターゼモノクローナル抗体(オルガノンテクニカ社)を平底マイクロタイタートレイの各ウェルに吸着固定し、洗浄後BSA溶液でブロックして固相化抗体トレイを調製した。抗エラスターゼポリクローナル抗体(バインディングサイト社)にホースラディッシュペルオキシダーゼを常法により標識した。

【0043】前記実施例1の希釈試料3μlを、前記エラスターゼモノクローナル抗体を不溶化した平底マイクロタイタートレイのウェルに加え、0.1(W/V)% BSAを含むPBSを100μl追加し、室温で30分間一次反応した。次に前記標識抗体溶液100μlを加え、室温で30分二次反応した。洗浄後に基質溶液(オルトフェニレンジアミン/過酸化水素)を加え、室温で15分間反応した後、3N硫酸溶液にて反応を停止し、490nmにて吸光度を測定し、ゼロブランクの吸光度との差を計算した。

【0044】エラスターゼの標準液についても上記と同様の操作で吸光度を測定し、0ブランクの吸光度との差を計算し、標準液の各濃度とそれぞれの吸光度差との関係をプロットすると共に、3次元のログ-ロジット計算式により

【図2】に示す標準曲線を作成した。該標準曲線により前記希釈試料の吸光度差からエラスターゼ濃度を計算した。

【0045】実施例3

粒径0.27μmのスチレン-メタクリル酸共重合ラテックスの赤色着色粒子(日本合成ゴム社)に、前記実施例1と同様の方法で抗エラスターゼモノクローナル抗体(オルガノンテクニカ社)を感作し、0.6(W/V)

%ポリビニルアルコール-BSA-GSBで浮遊して、赤色ラテックス標識抗エラスターゼ抗体を得た。

【0046】孔径8μmのニトロセルロースメンブラン(ザルトリウス社)を長さ80mm×幅60mmの大きさに切断し、抗エラスターゼポリクローナル抗体(バインディングサイト社)の1g画分2mg/ml溶液を、直径1mmのノズルから正確な量の試薬を射出することのできるマイクロプロセス制御式超小型注射器を用いて、ニトロセルロースメンブランの長さ方向の一端(下端)から37mm、39mm、42mmのところに、幅1mmの線を60mmの幅方向に描くように3本塗布して検出部を形成し、室温で1時間乾燥させた後、2(W/V)%BSA溶液に室温で30分浸漬し、ニトロセルロースメンブランの余分の結合部位をブロックした。該ニトロセルロースメンブランを精製水で十分すすいだ後、30℃で30分乾燥した。

【0047】次に、60(W/V)%のサッカロースを精製水に溶かした溶液を、マイクロプロセス制御システムを取り付けたエアブラシにより、前記ニトロセルロースメンブランの検出部を形成した側の片面に、全面塗布して下塗り層を形成した。

【0048】更に、前記赤色ラテックス標識抗エラスターゼ抗体を、前記エアブラシにより、前記下塗り層を形成したニトロセルロースメンブランの下端から7mmあけて幅方向に10mmの幅で、前記エアブラシにより前記下塗り層の上に直接塗布して、着色粒子標識抗エラスターゼ抗体含有部を形成し、30℃で30分乾燥した。該ニトロセルロースメンブランの下端から7mmの範囲を試料添加部とした。

【0049】このニトロセルロースメンブランを6mmの幅で長さ方向に切断し、アクリル樹脂製支持体(6×80mm)に両面接着テープにより貼付し、イムノクロマト用吸水パッド6×10mm(ポール社)を、前記ニトロセルロースメンブランに形成した検出部の上方(展開移動方向下流側)に貼付して吸収部を形成しイムノクロマト用測定試薬を調製した。

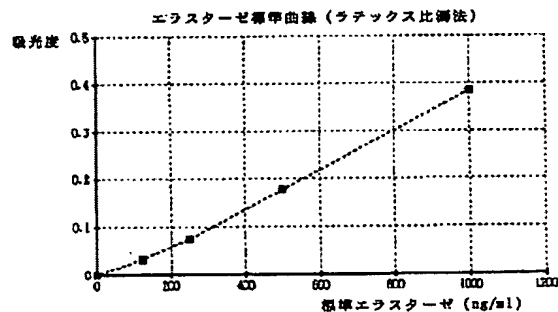
【0050】前記実施例1と同様の方法で採取・希釈した歯周ポケット内容物希釈試料の入った分割型のマイクロタイタートレイのウェルに、イムノクロマト測定試薬の試料添加部を差し込んで立てると、希釈試料中の顆粒球エラスターゼ等の成分が、水とともに下塗り層を溶かしながらしみ込むようにして、クロマトグラフ媒体であるニトロセルロースメンブラン内を毛細管現象によって上方に展開移動し始める。

【0051】希釈試料中のエラスターゼ等の成分が着色粒子標識抗エラスターゼ抗体含有部に到達すると、エラスターゼが存在する場合は、エラスターゼと赤色ラテックスで標識された抗エラスターゼ抗体とが抗原抗体反応し、抗原抗体複合体を形成しながら更に上方に展開移動する。赤色ラテックスで標識された抗エラスターゼ抗体

はモノクローナル抗体であるので、エラスターゼと抗原抗体反応して結合するが、抗エラスターゼモノクローナル抗体と結合したエラスターゼは、周囲にある他の抗エラスターゼモノクローナル抗体とは二次反応できないため、大きな凝集塊が形成されることなく、クロマトグラフ媒体内を展開移動する。

【0052】エラスターゼ抗原抗体複合体が検出部に到達すると、該検出部に固相化された抗エラスターゼポリクローナル抗体に、エラスターゼ-赤色ラテックス標識抗エラスターゼ抗体の抗原抗体複合体が、抗原抗体反応により順次捕捉され、上流側の抗エラスターゼ抗体固相化部位に第一の着色バンドが発現する。前記歯周ポケット内容物希釈試料中にエラスターゼが存在しなければ、抗原抗体反応は起こらず、着色バンドは認められない。又エラスターゼが比較的多く存在する場合には、第一の抗エラスターゼ固相化部位が飽和されて、捕捉出来な

【図 1】



った抗原抗体複合体が第二の抗エラスターゼ抗体固相化部位で捕捉されて第二の着色バンドが発現する。更にエラスターゼが大量に存在する場合は、第二の抗エラスターゼ抗体固相化部位が飽和され、第三の着色バンドが発現する。約15分で上端の吸水パッドに赤色ラテックス標識抗エラスターゼ抗体が移行し終わり、目視により検出部の赤色に染まったバンドを確認して、判定した。

## 【0053】

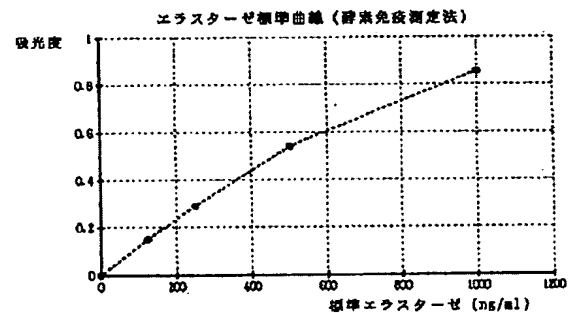
【発明の効果】以上述べたように本発明によれば、歯周ポケット採取試料中の白血球のうち顆粒球由来のエラスターゼを、溶血希釈して免疫学的測定試薬で検出・測定することにより、比較的簡単に、短時間で精度よく歯周ポケットエラスターゼを測定できる。

## 【図面の簡単な説明】

【図 1】本発明の一実施例を示した説明図である。

【図 2】本発明の他の実施例を示した説明図である。

【図 2】



◆◆◆◆◆ フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>

識別記号

F I

テ-マ-ト\* (参考)

G 0 1 N 33/531  
33/577

G 0 1 N 33/577  
A 6 1 C 19/04

B  
Z

F タ-ム (参考) 2G045 AA25 BB29 BB40 BB42 CA21  
CB01 CB05 CB06 CB21 DA20  
FA18 FB01 FB03 FB06 FB07  
FB11 GA05 GC12  
4B063 QA01 QA07 QA19 QD02 QD36  
QD96 QR48 QR84 CS03 CS20  
CS33 CS36 QX01  
4C052 AA20 ND1 NN11